

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2003-322655

(43)Date of publication of application : 14.11.2003

(51)Int.Cl.

G01N 33/579

G01N 1/00

(21)Application number : 2002-130811

(71)Applicant : DAICEN MEMBRANE SYSTEMS  
LTD

CENTRAL FILTER MFG CO LD

(22)Date of filing : 02.05.2002

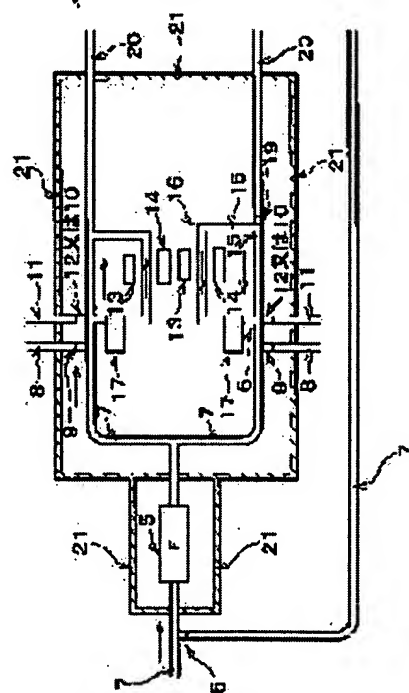
(72)Inventor : ISHII KIYOSHI  
HARADA TOKUZO  
MIURA KAORU

## (54) APPARATUS FOR MEASURING CONCENTRATION OF ENDOTOXIN

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide an apparatus for measuring the concentration of endotoxin capable of incorporating part of a specimen liquid such as drugs from a storage tank, etc., for the specimen liquid by a pipe and continuously monitoring the concentration of endotoxin of a liquid of a low concentration of 50 EU/L or less in a short time.

SOLUTION: The apparatus for measuring the concentration of the endotoxin comprises a means for incorporating the specimen liquid containing the endotoxin in a measuring circuit and sealing it; a means for circulating the sealed specimen liquid in the measuring circuit; a means for injecting a limulus reagent in the circulating specimen liquid and mixing both liquids; a particulate counting means for continuously measuring the concentration of particulates with the passage of time which occur in the mixed liquids introduced to a measuring cell; and a means for discharging the mixed liquids from the measuring circuit and cleaning the measuring circuit. By measuring the time required for a count value of the particulate counting means to reach a predetermined amount of change or the rate of change of the amount of change with the passage of time, the concentration of the endotoxin is computed in the apparatus for measuring the concentration of the endotoxin.



## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of  
rejection]

[Kind of final disposal of application other than the

examiner's decision of rejection or application  
converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of  
rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's  
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

\* NOTICES \*

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

CLAIMS

---

[Claim(s)]

[Claim 1] A means to incorporate and block the specimen liquid containing endotoxin in the measuring circuit containing a measurement cel, A means to circulate the specimen liquid by which the incorporation blockade was carried out in a measuring circuit, and a means to pour the RIMURUSU reagent of the specified quantity into the specimen liquid through which it circulates, and to mix both liquid, the particle which measures continuously aging of the concentration of a particle leading to the turbidity generated in the mixed liquor introduced into the measurement cel -- counting -- with a means a means to discharge mixed liquor out of a measuring circuit after measurement, and to wash a measuring circuit -- since -- the measuring device of the becoming endotoxin concentration -- it is -- the above-mentioned particle -- counting -- with a means The measuring device of the endotoxin concentration characterized by calculating the concentration of the endotoxin contained in specimen liquid by measuring the rate of aging of the time amount to which enumerated data reach predetermined variation, or this variation.

[Claim 2] before incorporating the specimen liquid containing endotoxin in a measuring circuit -- beforehand -- a particle -- counting -- the measuring device of the endotoxin concentration according to claim 1 characterized by establishing a filtration means by which the particle more than the diameter of min in which a means carries out counting is removable.

[Claim 3] a particle -- counting -- the particle which sets to 0.5 micrometers or less the minimum diameter of the particle which carries out counting of the means -- counting -- the measuring device of the endotoxin concentration according to claim 1 characterized by consisting of an electronic circuitry where variation calculates the time amount which reaches the specified quantity, or the rate of aging of variation, and calculates the endotoxin concentration in specimen liquid from the total and its enumerated data as contrasted with the calibration curve created beforehand.

[Claim 4] The measuring device of the endotoxin concentration according to claim 1 characterized by measuring continuously at spacing shorter than the time amount which combines two or more system of measurement with the passage of specimen liquid possible [ the change to juxtaposition ], switches automatically in order, and performs measurement of a particle, and washing of the measuring circuit containing a measurement cel in parallel, or one measurement takes.

[Claim 5] Two or more system of measurement is the measuring devices of the endotoxin concentration according to claim 4 characterized by consisting of a measuring circuit containing two or more measurement cels which have arranged the revolving shaft which fixed the photodetector corresponding to the single light source and single it on the concentric circle periphery made into a medial axis.

[Claim 6] Two or more system of measurement is the measuring devices of the endotoxin concentration according to claim 4 characterized by consisting of a photodetector corresponding to the single light source and single it which carry out an advancing-side-by-side round trip to two or more measurement cels juxtaposed to the single tier.

[Claim 7] The measuring device of the endotoxin concentration according to claim 1 to 6 characterized by measuring the mixed liquor which mixes both liquid and is obtained after making specimen volume

into an amount an amount - 1000 times 10 times to the amount of RIMURUSU reagents, when the endotoxin concentration in specimen liquid is a low.

---

[Translation done.]

## \* NOTICES \*

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. \*\*\*\* shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

---

## DETAILED DESCRIPTION

---

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of the Invention] This invention relates to the measuring device of endotoxin concentration. In more detail Drugs, such as a parenteral solution, an infusion solution, and dialysing fluid, If it exists in the intermediate product and the purified water which becomes some of these raw materials, the concentration of the endotoxin which shows variegated bioactive and is evil will be measured. While using it for medical care, it is related with the measuring device of the endotoxin concentration used in order to use for quality control of the purified water which becomes some of drugs, such as a parenteral solution under manufacture or storage, an infusion solution, and dialysing fluid, intermediate products of those, or these raw materials as drugs etc.

[0002]

[Description of the Prior Art] Endotoxin is a heat-resistant toxin which exists in the adventitia of Gram negative bacterium, and is called endotoxin, and it is supposed that it is a body lipopolysaccharide. Although lipopolysaccharide consists of the lipid and sugar chain which are called lipid A, the active center as endotoxin is in lipid A, and almost all activity is reproduced by the separated lipid A.

[0003] Endotoxin shows variegated bioactive, such as effect on the circulatory system, such as acceleration of a reaction of a blood coagulation line, reduction of a platelet and a leucocyte, lowering of blood pressure, and a shock, generation of heat, induction of cytokine, and effect on an immune system, (the volume for Shingo Takezawa, the book which dialysing fluid endotoxin understands well, 15-24 pages and 45-51 pages (1995), the Tokyo medicine company). The Gram negative bacterium which makes endotoxin one constituent exists underwater or in food among air, and on the occasion of fission of a biomass in that a biomass receives a mechanical damage or killed bacteria dissolves \*\*\*\*, endotoxin will be emitted into a solution and it will exist in a solution.

[0004] Directly [ endotoxin ] or indirectly Therefore, drugs, such as a parenteral solution, an infusion solution, and dialysing fluid, Since there is evil which shows the above-mentioned variegated bioactive when it mixes into the intermediate product and the purified water which becomes some of these raw materials or exists, measuring the concentration of endotoxin While using it for medical care, it is required for quality control of the purified water which becomes some of drugs, such as a parenteral solution under manufacture or storage, an infusion solution, and dialysing fluid, intermediate products of those, or these raw materials as drugs. Moreover, acting as the monitor of the concentration of endotoxin is effective also as a means to detect growth of a viable cell at an early stage. However, in the actual condition, the equipment which acts as the monitor of the endotoxin concentration does not exist, but extracts specimen liquid, measures endotoxin concentration off-line, and is using it for these quality control.

[0005] Only a limulus test (Limulus test) occurs as an approach of carrying out quantum measurement of the concentration of endotoxin. Before existing in the corpuscle of a king crab (Limuluspolyphemus), endotoxin activates a freezing characteristic enzyme (Proclotting Enzyme), this approach uses the reaction used as coagulase (Clotting Enzyme), is the approach of using limulus amebocyte lysate

(Limulus amoebocyte lysate) as a reagent, and has the three approaches of nephelometry and a colorimetric method as the gelling method and a high sensitivity measuring method.

[0006] It be the approach of measure turbidity change generate in the process which said coagulase act on the freezing characteristic protein (Coagulogen) which exist in a king crab corpuscle in the nephelometry of a high sensitivity measuring method, make it coagulated albumin (Coagulin), and form gel with optical analysis equipment, and there be end point assay and the Kaine tick method in this, and it be a quantitative approach (although it do not come to make the whole gel when endotoxin concentration be low). End point assay is an approach based on the turbidity (absorbance) which reaches in fixed time amount being proportional to endotoxin concentration. There is a nephelometry reaction-time method based on the logarithm of the time amount to which the rate of change of nephelometry reaction rate assay and turbidity based on the rate of aging of turbidity (absorbance) being proportional to endotoxin concentration reaches the threshold set up beforehand being in inverse proportion to the logarithm of endotoxin concentration among the Kaine tick methods. Generally the Kaine tick method is used (the volume for Shingo Takezawa, the book which dialysing fluid endotoxin understands well, 36-39 pages (1995), the Tokyo medicine company).

[0007] By the endotoxin density measurement device by the existing nephelometry, the reaction time for 90 - 150 minutes is required to detect to concentration 1 EU/L (Shingo Takezawa, the Ishizaki \*\*\*\*\*, southeast north water quality examination meeting edit, a dialysing fluid endotoxin location survey collection, 93 pages (1997), MEDIKA Publication). As a monitor of the endotoxin concentration of the low concentration liquid of 50 or less EU/L of endotoxin concentration, and the HDF dialysing fluid with which 10 - <1 EU/L level is demanded especially, time amount starts too much and was inadequate. Moreover, the amount of measurement specimens was difficult to restrict volume, such as a measurement cel, from constraint of the amount of RIMURUSU reagents (0.1-0.05cm<sup>3</sup>), and equivalent weight, furthermore to circulate through mixed liquor.

[0008]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] This invention takes an example by the trouble of the above-mentioned conventional technique. Drugs, such as a parenteral solution, an infusion solution, and dialysing fluid, From the storage tank or supply lines of specimen liquid, such as the intermediate product and purified water Some specimen liquid can be incorporated in a pipe and it can act as the monitor of the concentration of endotoxin continuously. And the concentration of endotoxin offers a technical problem the measuring device of the low concentration liquid of 50 or less EU/L, and the endotoxin concentration which can carry out a monitor even if it is the super-low concentration liquid of 10 - <1 EU/L level, and can moreover carry out the monitor of the concentration of endotoxin for a short time especially.

[0009]

[Means for Solving the Problem] this invention person etc. completed a header and this invention for a good result being obtained, when each means was combined with specification so that some specimen liquid might be incorporated, the specific turbidity meter with which endotoxin can also measure low concentration might be adopted from the storage tank or supply lines of specimen liquid, such as drugs, such as a parenteral solution, an infusion solution, and dialysing fluid, an intermediate product of those, and purified water, and it might make it possible to discharge the specimen liquid which measured concentration in view of the above-mentioned technical problem.

[0010] Namely, a means to incorporate and block the specimen liquid containing endotoxin in the measuring circuit containing a measurement cel according to invention of the 1st of this invention, A means to circulate the specimen liquid by which the incorporation blockade was carried out in a measuring circuit, and a means to pour the RIMURUSU reagent of the specified quantity into the specimen liquid through which it circulates, and to mix both liquid, the particle which measures continuously aging of the concentration of a particle leading to the turbidity generated in the mixed liquor introduced into the measurement cel -- counting -- with a means a means to discharge mixed liquor out of a measuring circuit after measurement, and to wash a measuring circuit -- since -- the measuring device of the becoming endotoxin concentration -- it is -- the above-mentioned particle --

counting -- with a means The measuring device of the endotoxin concentration characterized by calculating the concentration of the endotoxin contained in specimen liquid is offered by measuring the rate of aging of the time amount to which enumerated data reach predetermined variation, or this variation.

[0011] before [ moreover, ] incorporating the specimen liquid containing endotoxin in a measuring circuit in the 1st invention according to invention of the 2nd of this invention -- beforehand -- a particle - counting -- the measuring device of the endotoxin concentration according to claim 1 characterized by establishing a filtration means by which the particle more than the diameter of min in which a means carries out counting is removable is offered.

[0012] moreover -- according to invention of the 3rd of this invention -- the 1st invention -- setting -- a particle -- counting -- a means the particle which sets to 0.5 micrometers or less the minimum diameter of the particle which carries out counting -- counting -- the total and the time amount to which variation reaches the specified quantity from the enumerated data -- Or the measuring device of the endotoxin concentration characterized by consisting of an electronic circuitry which calculates the rate of aging of variation and calculates the endotoxin concentration in specimen liquid as contrasted with the calibration curve created beforehand is offered.

[0013] Furthermore, the measuring device of the endotoxin concentration characterized by to measure continuously at spacing shorter than the time amount which combines two or more system of measurement with the passage of specimen liquid possible [ the change to juxtaposition ], switches automatically in order in the 1st invention, and performs measurement of a particle and washing of the measuring circuit containing a measurement cel in parallel, or one measurement takes according to invention of the 4th of this invention is offered.

[0014] Furthermore, according to invention of the 5th of this invention, in the 4th invention, the measuring device of the endotoxin concentration according to claim 4 characterized by two or more system of measurement consisting of a measuring circuit containing two or more measurement cels which have arranged the revolving shaft which fixed the photodetector corresponding to the single light source and single it on the concentric circle periphery made into a medial axis is offered.

[0015] Furthermore, according to invention of the 6th of this invention, in the 4th invention, the measuring device of the endotoxin concentration according to claim 4 characterized by two or more system of measurement consisting of a photodetector corresponding to the single light source and single it which carry out an advancing-side-by-side round trip to two or more measurement cels juxtaposed to the single tier is offered.

[0016] Furthermore, according to invention of the 7th of this invention, in the 1-6th ones of invention, when the endotoxin concentration in specimen liquid is a low, after making specimen volume into an amount an amount - 1000 times 10 times to the amount of RIMURUSU reagents, the measuring device of the endotoxin concentration characterized by measuring the mixed liquor which mixes both liquid and is obtained is offered.

[0017]

[Embodiment of the Invention] Hereafter, the measuring device of the endotoxin concentration of this invention is explained to a detail for every item.

[0018] 1. Means to Incorporate and Block Specimen Liquid Containing Endotoxin in Measuring Circuit Containing Measurement Cel [0019] 1.1 With Specimen Liquid Which Contains Endotoxin in Specimen Liquid this Invention Containing Endotoxin They are drugs, such as a parenteral solution, an infusion solution, and dialysing fluid, an intermediate product of those, or purified water that becomes some of these raw materials. When specimen liquid is stored in storage means, such as \*\*\*\*, a tank, a carboy, a plastic envelope, and a plastics bag, and specimen liquid is used for the original object It is sent to the service space and activity device for which specimen liquid is used with transport means (1), such as a pipe which makes a part of storage means a starting point, tubing, and a hose. Although some specimen liquid which flows the inside of the specimen liquid stored in the above-mentioned storage means (not shown) or the above-mentioned transport means (1) is introduced into the measuring device of the endotoxin concentration of this invention and the concentration of endotoxin is measured In order to

sample, transport means (2), such as another pipe, tubing, and a hose, and (7 of drawing 2 ) are prepared in a part of above-mentioned transport means (1), and some specimen liquid is incorporated as a branch in the measuring circuit (15 of drawing 3 (A)) of the measuring device of the endotoxin concentration of this invention.

[0020] 1.2 the particle which a measurement cel (16 of drawing 3 (B), 16 of drawing 4 ) is a cel (chamber) which measures the concentration of the endotoxin in specimen liquid in measurement cel this invention, and is used by this invention -- counting -- into the mixed liquor which some totals were constituted, and endotoxin and a RIMURUSU reagent reacted, and generated coagulated albumin (particle), irradiate the flux of light from the light source in here, and measure the number of particles. A measurement cel is a part of measuring circuit explained to a detail below. Since the transparency over light is required as a raw material of a measurement cel, high grade glass, quartz glass, etc. are desirable.

[0021] 1.3 It is the circuit where a measuring circuit (15 of drawing 3 (A), 15 of drawing 4 ) makes specimen liquid recycle in measuring circuit this invention (circulation), and the above-mentioned measurement cel is included in a part, and although you may be what kind of structure as long as it is the structure where the remainder can recycle specimen liquid, it is desirable to consist of circular pipes (tubing). Although not limited especially about the construction material of a pipe (tubing), polytetrafluoroethylene (Teflon (R)), fluororesin, the lined metal, a non-lining metal, the ceramics, etc. are mentioned, and especially polytetrafluoroethylene (Teflon (R)) is desirable from viewpoints, such as non-adsorbent one and detergency. in addition, the thing for which the inside of a measuring circuit is circulated in this invention although the amount of mixed liquor is restricted a little -- a particle -- counting -- while being able to make the floating condition in the measurement cel which is the requirement of measurement by the total continue, there is effectiveness which makes homogeneity mixing and the reaction of specimen liquid and a RIMURUSU reagent, and raises the accuracy of measurement, and it is begun and proposed by this invention. By preparing a static mixer in a part of measuring circuit, mixing can be ensured early.

[0022] 1.4 In incorporation means this invention, incorporation is incorporating the specimen liquid containing endotoxin in the measuring circuit containing a measurement cel, and is transport means (2), such as a pipe explained by the above 1.1, \*\*, and a hose, and (7 of drawing 2 ) as the means. Although the structure of a transport means (2) may be what kind of structure as long as it is the structure where specimen liquid can be conveyed, it is desirable to consist of circular pipes (tubing). Although not limited especially about the construction material of a pipe (tubing), polytetrafluoroethylene (Teflon (R)), fluororesin, the lined metal, a non-lining metal, the ceramics, etc. are mentioned, and especially polytetrafluoroethylene (Teflon (R)) is desirable from viewpoints, such as non-adsorbent one and detergency. In addition, the incorporation pump 4 of specimen liquid is an auxiliary pump, and when incorporating from the line where specimen liquid is fed, it can be omitted. moreover, the barrier filter 5 of specimen liquid -- the particle in specimen liquid -- counting -- when there are few particles more than the diameter of min in which the total carries out counting, it can omit.

[0023] In Means this Invention to Block 1.5 With Blockade It is blocking the specimen liquid containing endotoxin in the measuring circuit containing a measurement cel. It is the thing which enables it to circulate through the specimen liquid which blocks the inlet port and outlet of a measuring circuit, is made to form a measuring circuit, and contains endotoxin in a measuring circuit. As a blockade means Although you may be the thing of what kind of structure as long as it can block the inlet port and outlet of a measuring circuit, a sluice valve (gate valve), a globe valve (globe valve), a cock (conical plug valve), a ball valve, etc. are mentioned. The valve 9 which pours in a penetrant remover, and the valve 12 which pours in a RIMURUSU reagent can be made the partition with the capacity which carries out self-closeout if extraction of the capillary is carried out for punching by capillaries, such as a check valve or a hypodermic needle. What is necessary is just to specifically change into the bulb of V1, V3, and V4 grade, or the condition of having closed the partition which can be opened and closed, in drawing 3 . When the RISUMUSU reagent transfer pipet 10 is formed instead of V3, RISUMUSU reagent transfer pipet should just change into the close condition.



[0024] 2. Use a pump (17 of drawing 3 , 17 of drawing 4 ) in means this invention which circulates the specimen liquid by which the incorporation blockade was carried out in a measuring circuit as a means to circulate the specimen liquid by which the incorporation blockade was carried out in a measuring circuit.

[0025] 3. In means this invention which the RIMURUSU reagent of the specified quantity is poured [ this invention ] into the specimen liquid through which it circulates, and mixes both liquid, as a means which pours the RIMURUSU reagent of the specified quantity into the specimen liquid through which it circulates, mixes both liquid, and builds mixed liquor, although a pump is used, the pump indicated to above-mentioned 2. may be made to serve a double purpose. The activity of the diaphragm pump which is easy to wash of a pump is desirable. In addition, in a measuring circuit, in order to improve mixing of both liquid, a mixer 18 may be installed as an option. There are various SUTATIKU mixers, the fiber aggregate, etc. as a mixer 18. Although you may be what kind of gestalt as long as a means to pour in a RIMURUSU reagent is the gestalt which can pour in a RIMURUSU reagent, the micro syringe with an impregnation needle (it may be called the RIMURUSU reagent transfer pipet 10) in which position control is possible is mentioned by the micropump (the check valve of a delivery may serve as a valve 12), or the micro motor, for example. When using the RIMURUSU reagent transfer pipet 10, if it changes to a closing motion bulb and extraction of the capillary is carried out for punching by capillaries, such as a hypodermic needle, to the location of the closing motion bulb 12, it will be made the partition with the capacity which carries out self-closeout. In this case, it is not necessary to use the RIMURUSU reagent feed pipe 11.

[0026] 4. Particle -- Counting -- Means this Invention -- Setting -- Particle -- Counting -- with Means It is a means to measure continuously aging of the enumerated data of a particle leading to the turbidity generated in the mixed liquor introduced into the measuring circuit, to process the measured value, and to calculate the endotoxin concentration in a specimen. The light source (13 of drawing 4 , 13 of drawing 5 ), The output of a photodetector (14 of drawing 4 , 14 of drawing 5 ) and a photodetector is calculated, and it consists of an electronic circuitry displayed and recorded and a measurement cel. this particle -- counting -- the particle which can be used for a means -- counting -- as an example of the total, the following means indicated by the Japanese patent No. 3151036 is mentioned. namely, a particle -- counting -- a means with the source 13 of coherent light, and the optical system which condenses the light from this source of coherent light The measurement cel 16 in which it is arranged near the focus of the flux of light condensed by this optical system, and the flow of the fluid containing a particle passes through the interior, The electrical circuit 23 which is on the optical path of the flux of light, and measures the number of the particle in a fluid to the measurement cel 16 from the electrical signal from the photodetector 14 arranged with the light source of the flux of light in the opposite hand and this photodetector 14 can constitute. A lens can perform condensing of the flux of light from the source of coherent light.

[0027] Although a measurement cel can be made from the ingredient of arbitration, such as glass, the part which the flux of light passes must be transparent. Semiconductor laser can be used as a source of coherent light, and a photodetector can be used as a photodiode. The source of coherent light can consist of a laser oscillator and a collimator lens. Although the thing of arbitration can be used as a laser oscillator, the more oscillation wavelength is short, the more detection sensitivity improves. The description of the detection approach is in the point that a laser oscillator with a small oscillation output, for example, semiconductor laser, can be used for the light source. An output can specifically measure even 1mW or less even of 0.2mW semiconductor laser.

[0028] A condensing system and optical lens A focal distance is chosen with the magnitude of a particle to detect. For example, when detecting the particle whose particle size is 0.2 micrometers, a lens with a focal distance of  $f=10\text{mm}$  can be used. A measurement cel needs to make transparence the light-receiving side and transparency side of focusing light at least. Although it can be made simple structure since this measurement cel does not need to worry about the stray light, it is desirable to establish the means it is made for a turbulent flow not to generate with the flow of the tested fluid containing a particle, for example, a laminar-flow plate, in an optical cel. It is desirable to establish the centering-

control means for arranging an optical lens so that the focusing light which came out of laser and converged with actual equipment may be condensed by the position of a measurement cel, for example, the core of a measurement cel.

[0029] Since it is in the duty of a photodetector 14 detecting the diffraction figure hidden by the transmitted light, sensibility is not needed so much. Although a single photodiode can be used theoretically, it is desirable to use a photodiode array. As for this photodiode array, it is desirable to arrange vertically to the flow direction containing a detected particle, and to arrange vertically also to an optical axis. The flux of light from the source of coherent light is condensed using a means. the above-mentioned particle -- counting -- It is made to pass near the focus of the flux of light which converged the flow of the fluid containing a particle. The photodetector which has arranged the diffracted light diffracted by the particle in a fluid on the optical path of the flux of light of an opposite hand with the light source of the flux of light to the flow of the fluid containing a particle detects, and it changes into an electrical signal. The minimum diameter can detect a particle 0.5 micrometers or less by measuring the number of the particle in a fluid from this electrical signal (measurement).

[0030] In Means this Invention to Discharge 5. With Blowdown The specimen liquid containing endotoxin is incorporated in the measuring circuit containing a measurement cel. Pour the RIMURUSU reagent of the specified quantity into the specimen liquid which is made to circulate through the specimen liquid by which the incorporation blockade was carried out in a measuring circuit, and circulates through it, and both liquid is mixed. It is discharging this mixed liquor for aging of the particle of mixed liquor out of a measuring circuit after measurement continuously, and they are transport means (20 of drawing 3 ), such as a pipe, tubing, and a hose, and a circulating pump as a source of power consumption for conveyance as the means. In addition, the closing motion bulb of a blowdown pipe will be opened, when circulating mixed liquor in a measuring circuit, and it will be closed and makes mixed liquor discharge.

[0031] Although the structure of a transport means may be what kind of structure as long as it is the structure where specimen liquid can be conveyed, it is desirable to consist of circular pipes (tubing). It is not limited especially about the construction material of a pipe (tubing). The activity of an elasticity tube (silicone rubber, elasticity PVC) is also possible.

[0032] 6. before incorporating the specimen liquid containing endotoxin in a measuring circuit with a filtration means in filtration means this invention -- a particle -- counting -- it is a means (5 of drawing 2 , 5 of drawing 4 ) by which the particle more than the diameter of min in which a means carries out counting is removable beforehand, and especially a microfilter made from a ceramic, a microfilter made of fluororesin, etc. that cannot adsorb the active ingredient in specimen liquid easily are desirable. In addition, it is desirable to establish after a microfilter a deaeration means (not shown) to remove air bubbles. Explanation of the means in this term corresponds to claim 2.

[0033] In Automatic Switchover Continuous Measurement Means this Invention of Multiple-Measurement System 7. With Automatic Switchover Continuous Measurement Means of Multiple-Measurement System It is "the means which combines with the passage of specimen liquid possible [ the change to juxtaposition ], and carries out automatic switchover \*\*\*\*\* of two or more system of measurement in order" of claim 4, and there are two cases. The system of measurement of "plurality of claim 5 " case which consists of two or more measurement cels which have arranged the revolving shaft which fixed the photodetector corresponding to the single light source and single it on the concentric circle periphery made into a medial axis, and claim 6 "two or more system of measurement There is a" case which consists of a photodetector corresponding to the single light source and single it which carry out an advancing-side-by-side round trip to two or more measurement cels. The case of claim 5 explains the case of claim 6 to following 7.1 in a detail further following 7.2.

[0034] In here, two or more system of measurement means that by which singular system of measurement has been arranged at or more two juxtaposition. Singular system of measurement is the measurement means 2 in the measuring device of the endotoxin concentration of one unit which consists of a means 3 to discharge and block the means 1, the measurement means 2 of specimen liquid, and specimen liquid which incorporate and block specimen liquid, as a conceptual diagram is shown in (A)

of drawing 1 . One system of measurement (unit) is those with 2 sequences, and juxtaposition, and two system of measurement shows what constituted this still more concretely to drawing 4 , as shown in (B) of drawing 1 . As three system of measurement is shown in (C) of drawing 1 , one system of measurement (unit) is those with 3 sequences, and juxtaposition.

[0035] In addition, it is the geometry of each means described above as a means 1 to incorporate and block specimen liquid, is the geometry shown in drawing 2 (A), and consists of the specimen liquid incorporation pipe 7, a barrier filter 5 and the detergent solution feed pipe 8, a specimen liquid closing motion bulb 6, and a detergent solution closing motion bulb 9. In addition, a deaeration means (not shown) may be established after a barrier filter 5. In the measurement means 2 of specimen liquid, it is the geometry shown in drawing 3 (A) and drawing 3 (B), and consists of a measuring circuit 15, the measurement cel 16, the light source 13, a detector 14, a circulating pump 17, a RIMURUSU reagent feed pipe 11, a closing motion bulb 12, and a mixer 18 (option). In a means 3 to discharge and block specimen liquid, it is the geometry of the blowdown pipe 20 shown in drawing 3 (A), and the closing motion bulb 19 of a blowdown pipe.

[0036] In addition, since the upstream consists of an incorporation pipe 7 of one specimen liquid, and one barrier filter 5 from the part which includes a barrier filter 5 as shown in (B) of drawing 2 , and (C) since a part of incorporation means of specimen liquid can be made to serve a double purpose in the case of two or more system of measurement, and a lower stream of a river cannot be made to serve a double purpose from these, the pipe has also been divided into 2 or 3. There is effectiveness it is ineffective to it being possible to shorten spacing of the density measurement of endotoxin as shown in drawing 6 , so that it is made two or more system of measurement.

[0037] 7.1 In Two or More Measurement Cel this Inventions Which Have Arranged Revolving Shaft Which Fixed Photodetector corresponding to Single Light Source and Single it on Concentric Circle Made into Medial Axis, although Light Source and Photodetector of Lot are Used to One System of Measurement (Measurement Cel) in Principle Since the light source and a photodetector are the things of an expensive rank and they will serve as a cost rise if the light source and the photodetector of a lot are attached at each system of measurement (measurement cel) in the case of two or more system of measurement (measurement cel) Fix the photodetector corresponding to the single light source and single it to the particular part of a measuring device, and rotate to two or more measurement cels, each system of measurement is made to carry out the sequential response of the particular part, and the number of the particles in a measurement cel is measured. The volume and weight of cost and density measurement equipment are excluded, it miniaturizes, carrying is made easy with space-saving, and it is effective in the ability to also reduce the count of a maintenance.

[0038] Explanation of the means in this term corresponds to claim 5, and is further explained to a detail as drawing 5 (A) based on (B). In drawing 5 (A), to one system of measurement (measurement cel 16), the light source 13 and the detector 14 of a lot are used, and this lot 13+14 is surrounded in a rectangle, and it has expressed. In drawing 5 (B), four system of measurement (the measurement cel 16 is compared with four \*\*\*\*\*) is shown in the upper case, and there are the light source 13 and the photodetector 14 of the lot which can be rotated which were fixed to the middle, and 13+14 is surrounded in a rectangle and it has expressed. Two or more system of measurement consists of a measuring circuit containing two or more measurement cels which have arranged the revolving shaft which fixed the photodetector corresponding to the single light source and single it on the concentric circle periphery made into a medial axis. The light source 13 and the photodetector 14 of the lot in the middle which can be rotated move to one system of measurement (measurement cel 16\*\*) fixed to the left end of an upper case, and it coalesces in it, and will be in the condition of \*\* of the lower berth, and the number of particles will be measured. Subsequently, from the left of an upper case, the light source 13 and the photodetector 14 of the lot in the middle which can be rotated move to the 2nd one fixed system of measurement (measurement cel 16\*\*), and it coalesces in it, and will be in the condition of \*\* of the lower berth, and the number of particles will be measured. One by one, the number of the particles of \*\* and \*\* is measured. A revolving shaft may be fixed and the measuring circuit containing two or more measurement cels arranged on a concentric circle periphery may be rotated.

[0039] 7.2 In Photodetector this Invention corresponding to Single Light Source and Single it Which Carry Out Advancing-Side-by-Side Round Trip to Two or More Measurement Cels, although Light Source and Photodetector of Lot are Used to One System of Measurement (Measurement Cel) in Principle Since the light source and a photodetector are the things of an expensive rank and they will serve as a cost rise if the light source and the photodetector of a lot are attached at each system of measurement (measurement cel) in the case of two or more system of measurement (measurement cel) The photodetector corresponding to the single light source and single it which carry out an advancing-side-by-side round trip to two or more measurement cels is attached, and the volume and weight of a cost cut and density measurement equipment are excluded, it miniaturizes, carrying is made easy with space-saving, and it is effective in the ability to also reduce the count of a maintenance.

[0040] Explanation of the means in this term corresponds to claim 6, and is further explained to a detail as drawing 6 (A) based on (B). In drawing 6 (A), to one system of measurement (measurement cel 16), the light source 13 and the photodetector 14 of a lot are used, and this lot 13+14 is surrounded in a rectangle, and it has expressed. In drawing 6 (B), the light source 13 and the photodetector 14 of a movable lot are shown in the upper case, and 13+14 is surrounded in a rectangle and it has expressed. An arrow head shows migration and it coalesces in four system of measurement (the measurement cel 16 is compared with four \*\*\*\*\*s.) currently fixed to the lower berth, respectively. That is, the movable light source 13 of a lot and the movable lot (13+14) of a photodetector 14 coalesce in the system of measurement (measurement cel 16) in the condition of \*\* of the lower berth, and the number of particles is measured. Subsequently, the movable light source 13 of a lot and the movable lot (13+14) of a photodetector 14 coalesce in the system of measurement (measurement cel 16) in the condition of \*\* of the lower berth, and the number of particles is measured. Furthermore, it coalesces in the system of measurement (measurement cel 16) in the condition of \*\* and \*\*, and the number of particles is measured.

[0041] 8. It is the structure which combined organically each means described above as the measuring device of the endotoxin concentration of measuring device this invention of endotoxin concentration. In superordinate concept, in the case of singular system of measurement, as a conceptual diagram is shown in (A) of drawing 1 , it is the measuring device of the endotoxin concentration of one unit which consists of a means 3 to discharge and block the means 1, the measurement means 2 of specimen liquid, and specimen liquid which incorporate and block specimen liquid. As shown in (B) of drawing 1 in the case of two system of measurement, one system of measurement (unit) is the measuring device of the endotoxin concentration of two units which is those with 2 sequences, and juxtaposition. What constituted this still more concretely is shown in drawing 4 . As shown in (C) of drawing 1 in the case of three system of measurement, one system of measurement (unit) is the measuring device of the endotoxin concentration of three units which is those with 3 sequences, and juxtaposition.

[0042] 9. In measuring method this invention of endotoxin concentration, be with the measuring device of the endotoxin concentration of this invention, and measure the concentration of endotoxin by the following approach. First, incorporation means, such as a pipe, convey specimen liquid to the measuring circuit containing a measurement cel with a pump from storage means, such as \*\*\*\* and the tank by which the specimen liquid (purified water which becomes some of drugs, such as a parenteral solution, an infusion solution, and dialysing fluid, intermediate products of those, or these raw materials) containing endotoxin is stored, a carboy, a plastic envelope, and a plastics bag, or the supply line to which these are flowing. In addition, the case from the supply line currently fed can omit a pump. in this case, the filter formed in said some of pipes before incorporating in a measuring circuit -- a particle -- counting -- the particle more than the diameter of min in which a means carries out counting is removed. Subsequently, the bulb of the inlet port of a measuring circuit and an inlet port is closed, and let a measuring circuit be a closed circuit, after putting in specimen liquid in a measuring circuit.

[0043] Subsequently, the specimen liquid in a measuring circuit is circulated. the particle which measures continuously aging of the particle which pours the RIMURUSU reagent of the specified quantity into the specimen liquid with which it circulates through the bulb of a RIMURUSU reagent feed pipe in an aperture and a measuring circuit, is made to circulate through specimen liquid and a

RIMURUSU reagent, builds both mixed liquor, and is generated in process of a gelation reaction -- counting -- it measures with a means and the concentration of endotoxin is calculated. Mixed liquor is discharged out of a measuring circuit after termination of measurement. For that purpose, the measured mixed liquor in a measuring circuit is discarded for the introduction bulb 6 and the bulb 19 of a blowdown pipe from a blowdown pipe with an aperture and the newly taken-in specimen liquid. In this case, in order to wash the inside of a measuring circuit, after washing the interior, or fixed-time-amount-circulating and making it to have introduced the bulb 9 of a penetrant remover pipe into the aperture, to have introduced the penetrant remover in the measuring circuit, and pile up, the mixed liquor in a measuring circuit may be made to flow out with a penetrant remover, and may be discarded.

[0044] 10. Specimen volume and the amount of RIMURUSU reagents measure the turbidity of the 0.1-0.2ml mixed liquor which mixes both liquid and is obtained by the ratio of 1:1 by the quiescent state, and measuring method usual in case the endotoxin concentration in specimen liquid is a low performs density measurement of endotoxin. however, the number of the particles which caused muddiness (from -- calculating -- concentration) -- a particle -- counting -- in order to measure in total, it is a requirement to cross the flux of light and to make mixed liquor flow. However, it is dramatically difficult for the volume of the excess for it to be needed and to make it flow with 0.1-0.2ml of the usual mixed liquor objects, even if it is circulation. the increase of a burden with economical since a RIMURUSU reagent is very the thing of an expensive rank even if it is going to increase mixed liquor increasing the amount used with equivalent weight to specimen volume -- dramatically -- large -- becoming -- a particle -- counting -- it becomes a serious failure in the case of measuring in total. Usually, it is thought that it remains without reacting with endotoxin, when most RIMURUSU reagents mixed with the specimen liquid of an amount have the low endotoxin concentration of specimen liquid. Therefore, even if it mixes the specimen liquid of an amount an amount - 1000 times 10 times to the amount of reagents, the endotoxin in specimen liquid is considered that a RIMURUSU reagent and the amount to which it reacts hardly change to the case of equivalent mixing. That is, since it measured for specimen liquid with the low concentration of endotoxin in this invention, after making specimen volume into an amount an amount - 1000 times 10 times to the amount of RIMURUSU reagents, measuring the particle which carries out by using the mixed liquor which mixes both liquid and is obtained, and is generated in process of a gelation reaction began, and it became possible. Explanation of the approach in this term corresponds to claim 7.

[0045] 11. As shown in automatic change diagram drawing 1 (C) in case the measurement cells of juxtaposition are three sequences, when measurement cells are three sequences, set spacing of fixed time amount, and measure a particle, and subsequently, the 1st sequence, the 2nd sequence, and the 3rd sequence set spacing of fixed time amount, and perform washing by the penetrant remover of each sequence one by one. If washing finishes, a particle will be measured one by one. The automatic change diagram in case the measurement cells of juxtaposition are three sequences was shown in drawing 9 . In addition, in this invention, if a penetrant remover does not have an adverse effect on specimen liquid, endotoxin, a RIMURUSU reagent, etc., and the reaction of endotoxin and a RIMURUSU reagent is not promoted or it is not checked even when a glycolipid and protein are dissolved and a minute amount remains, it may be what type of thing and can be chosen from a hydrochloric-acid water solution or a surfactant.

[0046] 12. In the nephelometry which measures the turbidity which the gestalt endotoxin and the RIMURUSU reagent of desirable operation react and generate especially, the nephelometry reaction-time method which measures the time amount which reaches the turbidity set up beforehand as a measuring method of specimen liquid with low endotoxin concentration, or the nephelometry reaction rate assay which measures the rate of aging of turbidity is used well (the volume for Shingo Takezawa, the book which dialysing-fluid endotoxin understands well, 37-38 pages (1995), the Tokyo medicine company).

[0047] When the concentration of endotoxin is low, it is required for a monitor that the logarithm of the time amount which reaches the turbidity set up beforehand should set setting-out turbidity as the measurable minimum value, and should make the measuring time the shortest the logarithm of

endotoxin concentration or since it becomes long in inverse proportion to a logarithm twice. Therefore, measuring with lower turbidity is important. then -- as a high sensitivity measuring method -- a turbidity meter -- changing -- a particle -- counting -- it is possible to use the total.

[0048] however, a particle -- counting -- the flux of light of the total is thin, and since that (= counting is carried out) which catches a particle in it becomes a probable phenomenon, it scans object liquid to statistically reliable counting (dozens of or more pieces) (the flux of light is fixed and it is a sink across boundaries about liquid), \*\* it to the volume (amount of transverse flow x time amount) which crossed the flux of light, and asks for concentration. That is, it is necessary to enlarge the volume which will be measured if the concentration of a particle becomes low under inverse proportion, and the measuring time becomes still longer. furthermore, being held in the space where the measuring object of a turbidity meter was restricted -- receiving -- a particle -- counting -- since it is an indispensable condition to cross the flux of light and to make it flow, 3 and since it is little, the volume of the reaction mixture which mixed the specimen which is the measuring object, and the RIMURUSU reagent is not easy for it 0.2-0.1cm, though the measuring object of the total makes a measurement cel circulate through reaction mixture by the closed system.

[0049] [Embodiment 1] Two or more equipments are combined with the passage of a specimen possible [ the change to juxtaposition ], as a fundamental example of the method which carries out automatic switchover \*\*\*\*\* in order, 2 sets of equipments (it is possible to share 1 set of light sources and an electric eye) are combined with the passage of object liquid possible [ the change to juxtaposition ], and the embodiment which carries out automatic switchover \*\*\*\*\* in order is shown in drawing 5 . The example of an automatic switchover actuation diagram in case the equipment of juxtaposition is three sequences is shown in drawing 9 .

[0050] Since the amount of the reaction mixture which carries out [embodiment 2] measurement mixes and prepares the specimen of the amount of the usually used reagent, and equivalent weight, it is as little as 3 0.1-0.2cm. For this reason, it is necessary to make content volume of a measurement cel or less [ 0.1cm ] into three. However, the RIMURUSU reagent should contain the active ingredient of an amount which can respond to the endotoxin more than a concentration 103 EU/L digit in amount of anticipated use of 0.1-0.05cm 3. Therefore, it is thought that most RIMURUSU reagents which made it usually mix with the specimen liquid of an amount in the case of the specimen of 101EU / level of L figures remain without reacting with endotoxin. Even if it mixes the specimen liquid of an amount an amount - 1000 times 10 times to the amount of reagents, the endotoxin in specimen liquid is considered that a RIMURUSU reagent and the amount to which it reacts hardly change to the case of equivalent mixing. In this invention, since it measured for specimen liquid with the low concentration of endotoxin, after making specimen volume into an amount an amount - 1000 times 10 times to the amount of RIMURUSU reagents, measuring the particle generated in process of a gelation reaction using the mixed liquor which mixes both liquid and is obtained began, and it became possible. that is, the amount of mixed liquor is set to 3 1-20cm, it is markedly alike to circulate through mixed liquor in a measurement cel as compared with the case where it is 3 0.1-0.2cm, and the amount of mixed liquor can do it easily.

[0051] Making sensibility high by making small the dimension of the particle which a [embodiment 3] turbidity meter measures is expected. Endotoxin and a RIMURUSU reagent react, and in the process which occurs, meets and gels eventually the very small coagulation object (particle) which caused muddiness, a particulate number is inversely proportional to the third [ about ] power of a dimension, and decreases. Therefore, although the volume of the mixed liquor which setting up the dimension of the particle to measure small measures by extracting the flux of light thinly decreases, the frequency of the particle which crosses the flux of light more than it becomes high, and after all, the measuring time carries out \*\*\*\* reverse proportion, and becomes short at the dimension of a particulate number. Moreover, it can be measured at the early stage of the process of the gelation reaction of endotoxin and a RIMURUSU reagent that a detection dimension can be set up small, and it will contribute to compaction of the measuring time.

[0052] If endotoxin concentration presumes the coagulation object particle concentration (counting-like



concentration) of very low specimen liquid to be 1 [EU/L] The weight concentration of endotoxin is 0.2 [ng/L] (E. in the coli 0113:H10 origin). It becomes the existing appearance "book of dialysing fluid ET known well" page 29, and since molecular weight is about 106 [g/mol] extent in the condition of having met, the endotoxin in dialysing fluid becomes the number concentration of  $1.2 \times 10^8$  [individual/L] extent. On the other hand, as for the diameter of the amphiphilic meeting object of about 106, molecular weight is presumed to be abbreviation  $(1-2) \times 10^{-2}$  [mum], and the coagulation object which these generated at the reaction with a RIMURUSU reagent carries out a steps set. a particle -- counting, if it grows up to be the minimum dimension 0.1->0.5->0.1 of the total, for example, a diameter, [mum] The concentration about  $1.2 \times 10^8$  as a particle of the first unreacted ET [an individual/L] is inversely proportional to the cube of a diameter ratio, and decreases. a particle -- counting -- the minimum limit of detection of the total, 0.1 [ for example, ], [mum] -- 102-103 pieces / mL, and 0.5 [mum] -- 100-101 pieces / mL, and 1 [mum] -- 10 -- it is set to -two to ten to one piece / mL.

[0053] When it is going to measure this coagulation object concentration with a particle counter, in order that what was not able to remove particles (it filters beforehand and removes), such as air bubbles (it deaerates beforehand and removes) which exist in dialysing fluid, and dust, may block as a noise, measure in the condition that counting of the particle of the endotoxin origin fell to the level of the number of noises loses the reliability of measured value. Therefore, it is so required that the endotoxin concentration of a specimen is low for the diameter of a coagulation object particle to measure in a small phase. It is guessed that it becomes below 101 piece / mL in the phase which grew to 0.5 micrometers when endotoxin concentration is 1 EU/L, and also when buried in a noise depending on a specimen, for a certain reason, about at least 0.5 micrometers or less of things preferably done for counting by about 0.2-0.1 micrometers become the indispensable condition which measures endotoxin concentration with a particle digital turbidity meter. This condition is in agreement also with the object which shortens the measuring time by measuring in the early phase of the reaction of endotoxin and a RIMURUSU reagent.

[0054]

[Example] This invention is not limited by these examples although this invention is explained more below at a detail based on an example.

[0055] The [example 1] specimen liquid incorporation pipe 7, the closing motion bulb 6, the detergent solution feed pipe 8 (drawing abbreviation), The closing motion bulb 9 (drawing abbreviation), a barrier filter 5 (drawing abbreviation), a deaerator (drawing abbreviation), The RIMURUSU reagent feed pipe 11, the closing motion bulb 12, a measuring circuit 15, the measurement cel 16, a circulating pump 17, a static mixer 18 (drawing abbreviation), The endotoxin density measurement equipment of one sequence which consists of combination of the closing motion bulb 19, the blowdown pipe 20, a thermostat 21 (drawing abbreviation) and the movable light source 13, and a photodetector 14 created to juxtaposition the endotoxin density measurement equipment with which list installation of the three sequences was carried out. This is shown in drawing 7.

[0056] In the [example 2] example 1, it changed to the RIMURUSU reagent feed pipe 11 and the closing motion bulb 12, and the equipment of an example 1 and the endotoxin density measurement equipment of the same structure were created except having adopted the micro syringe with an impregnation needle (RIMURUSU reagent transfer pipet 10) in which position control is possible by the micro motor.

[0057]

[Effect of the Invention] According to the equipment of this invention, from the storage tank or supply lines of specimen liquid, such as drugs, such as a parenteral solution, an infusion solution, and dialysing fluid, an intermediate product of those, and purified water, some specimen liquid can be incorporated in a pipe, and it can act as the monitor of the concentration of endotoxin continuously, and the concentration of endotoxin has the low concentration liquid of 50 or less EU/L, and the effectiveness which can carry out a monitor even if it is the super-low concentration liquid of 10 - <1 EU/L level, and can moreover carry out the monitor of the concentration of endotoxin for a short time especially.

---

[Translation done.]



(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2003-322655

(P2003-322655A)

(43)公開日 平成15年11月14日 (2003. 11. 14)

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テーマコード*(参考)
G 0 1 N 33/579		G 0 1 N 33/579	2 G 0 5 2
1/00	1 0 1	1/00	1 0 1 F
			1 0 1 N

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 12 頁)

(21)出願番号 特願2002-130811(P2002-130811)

(22)出願日 平成14年5月2日(2002. 5. 2)

(71)出願人 594152620

ダイセン・メンブレン・システムズ株式会  
社

大阪府堺市鉄砲町1番地

(71)出願人 595140114

セントラルフィルター工業株式会社

東京都新宿区新宿1丁目34番15号 第二東  
興ビル

(72)発明者 石井 清

東京都目黒区大岡山1-19-13

(74)代理人 100106596

弁理士 河備 健二

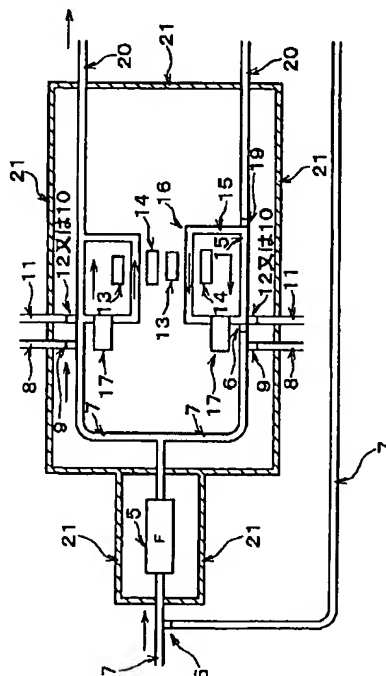
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 エンドトキシン濃度の測定装置

(57)【要約】

【課題】 医薬品などの検体液の貯蔵タンク等から、検体液の一部をパイプで取込みエンドトキシンの濃度を連続的に、かつ50 EU/L以下の低濃度液で、しかも短時間にモニターできるエンドトキシン濃度の測定装置の提供。

【解決手段】 エンドトキシンを含む検体液を測定回路内に取込み封鎖する手段と、封鎖された検体液を測定回路内で循環させる手段と、循環する検体液にリムルス試薬を注入して両液を混合させる手段と、測定セルに導入された混合液中に発生する微粒子の濃度の経時変化を連続的に測定する微粒子計数手段と、混合液を測定回路内から排出し測定回路を洗浄する手段とからなるエンドトキシン濃度の測定装置であって、上記微粒子計数手段で、計数値が所定変化量に到達する時間又は変化量の経時変化率を測定することによりエンドトキシンの濃度を算定することを特徴とするエンドトキシン濃度の測定装置を提供。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 エンドトキシンを含む検体液を測定セルを含む測定回路内に取込み封鎖する手段と、取込み封鎖された検体液を測定回路内で循環させる手段と、循環する検体液に所定量のリムルス試薬を注入して両液を混合させる手段と、測定セルに導入された混合液中に発生する濁度の原因となる微粒子の濃度の経時変化を連続的に測定する微粒子計数手段と、測定後に混合液を測定回路内から排出し、測定回路を洗浄する手段と、からなるエンドトキシン濃度の測定装置であって、上記微粒子計数手段で、計数値が所定変化量に到達する時間又は該変化量の経時変化率を測定することにより検体液中に含まれるエンドトキシンの濃度を算定することを特徴とするエンドトキシン濃度の測定装置。

【請求項2】 エンドトキシンを含む検体液を測定回路内に取込む前に、予め微粒子計数手段が計数する最小径以上の粒子を除去できる濾過手段を設けることを特徴とする請求項1に記載のエンドトキシン濃度の測定装置。

【請求項3】 微粒子計数手段は、計数する微粒子の最小直径を0.5 $\mu$ m以下とする微粒子計数計と、その計数値から変化量が所定量に到達する時間、または、変化量の経時変化率を算定して、予め作成された検量線と対比して検体液中のエンドトキシン濃度を算定する電子回路からなることを特徴とする請求項1に記載のエンドトキシン濃度の測定装置。

【請求項4】 複数の測定系を検体液の流路に並列に切換え可能に結合して、順繰りに自動的に切換えて、微粒子の測定と、測定セルを含む測定回路の洗浄を並行して行い、或いは、1回の測定に要する時間よりも短い間隔で連続測定することを特徴とする請求項1に記載のエンドトキシン濃度の測定装置。

【請求項5】 複数の測定系は、単一の光源とそれに対応する光検出器を固定した回転軸を中心軸とする同心円周上に配置した複数の測定セルを含む測定回路とからなることを特徴とする請求項4に記載のエンドトキシン濃度の測定装置。

【請求項6】 複数の測定系は、一列に並置した複数の測定セルに対して併進往復する単一の光源とそれに対応する光検出器とからなることを特徴とする請求項4に記載のエンドトキシン濃度の測定装置。

【請求項7】 検体液中のエンドトキシン濃度が低レベルの場合に、検体液量をリムルス試薬量に対して10倍量～1000倍量とした後、両液を混合して得られる混合液を測定することを特徴とする請求項1～6のいずれかに記載のエンドトキシン濃度の測定装置。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、エンドトキシン濃度の測定装置に関し、更に詳しくは注射液、輸液、透析液などの医薬品と、その中間製品、これらの原料の一部

となる精製水中に存在すると、多彩な生物活性を示し弊害があるエンドトキシンの濃度を測定し、医療に使用中、或いは医薬品として製造中、または貯蔵中の注射液、輸液、透析液などの医薬品と、その中間製品、又はこれらの原料の一部となる精製水の品質管理等に役立てるために使用するエンドトキシン濃度の測定装置に関する。

## 【0002】

【従来の技術】エンドトキシンは、グラム陰性細菌の外膜に存在する耐熱性の毒素であり菌体内毒素と言われ、本体はリボ多糖であるとされている。リボ多糖はリピドAとよばれる脂質と糖鎖からなるが、エンドトキシンとしての活性中心はリピドAにあり、分離したリピドAでほぼすべての活性が再現される。

【0003】エンドトキシンは血液凝固線の反応促進、血小板・白血球の減少、血圧の低下、ショックなど循環系への影響、発熱、サイトカインの誘導、免疫系への影響など多彩な生物活性を示す(竹沢真吾編、透析液エンドトキシンがよくわかる本、15～24頁及び45～51頁(1995)、東京医学社)。エンドトキシンを一構成成分としているグラム陰性細菌は、空气中、水中あるいは食品中に存在し、菌体が機械的損傷を受けたり、死菌が溶解したりあるいは菌体の分裂に際してエンドトキシンが溶液中に放出され、溶液中に存在することとなる。

【0004】したがって、エンドトキシンは、直接的または間接的に、注射液、輸液、透析液などの医薬品と、その中間製品、これらの原料の一部となる精製水中に混入したり、存在したりすると、上記した多彩な生物活性を示す弊害があるので、エンドトキシンの濃度を測定することは、医療に使用中、或いは医薬品として製造中または貯蔵中の注射液、輸液、透析液などの医薬品と、その中間製品、又はこれらの原料の一部となる精製水の品質管理に必要である。また、エンドトキシンの濃度をモニターすることは、生菌の増殖を早期に検出する手段としても有効である。しかし、現状ではエンドトキシン濃度をモニターする装置は存在せず、検体液を採取してオフラインでエンドトキシン濃度を測定して、これらの品質管理に役立てている。

【0005】エンドトキシンの濃度を定量測定する方法としては、唯一リムルス試験(Limulus test)がある。この方法は、カプトガニ(Limulus polyphemus)の血球中に存在する前凝固性酵素(Proclotting Enzyme)をエンドトキシンが活性化し、凝固酵素(Clottting Enzyme)とする反応を利用したものであり、カプトガニ血球抽出成分(Limulus amebocyte lysate)を試薬として使用する方法であり、ゲル化法と、高感度測定法として比濁法と比色法との三つの方法がある。

【0006】高感度測定法の比濁法では、カプトガニ血球中に存在している凝固性蛋白 (Coagglon) に前記凝固酵素が作用して、凝固蛋白 (Coagulin) にして、ゲルを形成する (エンドトキシン濃度が低い場合は全体をゲル化させるには至らないが、) 過程で発生する濁度変化を光学分析装置により測定する方法であり、これにはエンドポイント法とカイネティック法があり定量的な方法である。エンドポイント法は、一定時間内に到達する濁度 (吸光度) がエンドトキシン濃度に比例することに基づく方法である。カイネティック法には、濁度 (吸光度) の経時変化率がエンドトキシン濃度に比例することに基づく比濁反応速度法と濁度の変化率が予め設定した閾値に達する時間の対数がエンドトキシン濃度の対数に反比例することに基づく比濁反応時間法がある。カイネティック法が一般に用いられている (竹沢真吾編、透析液エンドトキシンがよくわかる本、36〜39頁 (1995)、東京医学社)。

【0007】既存の比濁法によるエンドトキシン濃度測定機器では、濃度  $1 \text{ EU/L}$  まで検出するには90〜150分の反応時間が必要である (竹沢真吾、石崎允監修、南東北水質検討会編集、透析液エンドトキシン実測集、93頁 (1997)、(株) メディカ出版)。エンドトキシン濃度  $50 \text{ EU/L}$  以下の低濃度液、特に  $10 \sim < 1 \text{ EU/L}$  レベルが要求されるHDF透析液のエンドトキシン濃度のモニターとしては時間がかかりすぎ不十分であった。また、測定検体量は、リムルス試薬量 ( $0.1 \sim 0.05 \text{ cm}^3$ ) と等量の制約から測定セルなどの容積が制限され、まして、混合液を循環することは困難であった。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、上記の従来技術の問題点に鑑み、注射液、輸液、透析液などの医薬品と、その中間製品、精製水などの検体液の貯蔵タンク又は供給ラインから、検体液の一部をパイプで取込みエンドトキシンの濃度を連続的にモニターすることができ、かつエンドトキシンの濃度が  $50 \text{ EU/L}$  以下の低濃度液、特に  $10 \sim < 1 \text{ EU/L}$  レベルの極低濃度液であってもモニターでき、しかもエンドトキシンの濃度を短時間にモニターできるエンドトキシン濃度の測定装置の提供を課題とする。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明者等は、上記の課題に鑑み、注射液、輸液、透析液などの医薬品と、その中間製品、精製水などの検体液の貯蔵タンク又は供給ラインから、検体液の一部を取込み、エンドトキシンが低濃度でも測定できる特定の濁度計を採用し、濃度を測定した検体液を排出することを可能とするように、各手段を特定に結合すると、良好な結果が得られることを見出し、本発明を完成させた。

【0010】すなわち、本発明の第1の発明によれば、

エンドトキシンを含む検体液を測定セルを含む測定回路内に取込み封鎖する手段と、取込み封鎖された検体液を測定回路内で循環させる手段と、循環する検体液に所定量のリムルス試薬を注入して両液を混合させる手段と、測定セルに導入された混合液中に発生する濁度の原因となる微粒子の濃度の経時変化を連続的に測定する微粒子計数手段と、測定後に混合液を測定回路内から排出し、測定回路を洗浄する手段と、からなるエンドトキシン濃度の測定装置であって、上記微粒子計数手段で、計数値が所定変化量に到達する時間又は該変化量の経時変化率を測定することにより検体液中に含まれるエンドトキシンの濃度を算定することの特徴とするエンドトキシン濃度の測定装置が提供される。

【0011】また、本発明の第2の発明によれば、第1の発明において、エンドトキシンを含む検体液を測定回路内に取込む前に、予め微粒子計数手段が計数する最小径以上の粒子を除去できる濾過手段を設けることを特徴とする請求項1に記載のエンドトキシン濃度の測定装置が提供される。

【0012】また、本発明の第3の発明によれば、第1の発明において、微粒子計数手段は、計数する微粒子の最小直径を  $0.5 \mu\text{m}$  以下とする微粒子計数計と、その計数値から変化量が所定量に到達する時間、または、変化量の経時変化率を算定して、予め作成された検量線と対比して検体液中のエンドトキシン濃度を算定する電子回路からなることを特徴とするエンドトキシン濃度の測定装置が提供される。

【0013】さらに、本発明の第4の発明によれば、第1の発明において、複数の測定系を検体液の流路に並列に切換え可能に結合して、順繰りに自動的に切換えて、微粒子の測定と、測定セルを含む測定回路の洗浄を並行して行い、或いは、1回の測定に要する時間よりも短い間隔で連続測定することの特徴とするエンドトキシン濃度の測定装置が提供される。

【0014】さらに、本発明の第5の発明によれば、第4の発明において、複数の測定系は、単一の光源とそれに対応する光検出器を固定した回転軸を中心軸とする同心円周上に配置した複数の測定セルを含む測定回路とからなることを特徴とする請求項4に記載のエンドトキシン濃度の測定装置が提供される。

【0015】さらに、本発明の第6の発明によれば、第4の発明において、複数の測定系は、一列に並置した複数の測定セルに対して併進往復する単一の光源とそれに対応する光検出器とからなることを特徴とする請求項4に記載のエンドトキシン濃度の測定装置が提供される。

【0016】さらに、本発明の第7の発明によれば、第1〜6のいずれかの発明において、検体液中のエンドトキシン濃度が低レベルの場合に、検体液量をリムルス試薬量に対して10倍量〜1000倍量とした後、両液を混合して得られる混合液を測定することの特徴とするエ

ンドトキシン濃度の測定装置が提供される。

【0017】

【発明の実施の形態】以下、本発明のエンドトキシン濃度の測定装置について、各項目毎に詳細に説明する。

【0018】1. エンドトキシンを含む検体液を測定セルを含む測定回路内に取込み封鎖する手段

【0019】1.1 エンドトキシンを含む検体液

本発明においてエンドトキシンを含む検体液とは、注射液、輸液、透析液などの医薬品と、その中間製品、又はこれらの原料の一部となる精製水などであり、検体液は貯槽、タンク、ガラス瓶、プラスチック容器、プラスチックバッグ等の貯蔵手段に貯蔵されており、検体液を本来の目的で使用するとき、貯蔵手段の一部を出発点とするパイプ、管、ホース等の輸送手段(1)で検体液が使用される使用場所や使用機器に送られる。上記貯蔵手段(図示せず)に貯蔵されている検体液又は上記輸送手段(1)中を流れる検体液の一部を、本発明のエンドトキシン濃度の測定装置に導入しエンドトキシンの濃度を測定するが、サンプリングするためには、上記輸送手段(1)の一部に別のパイプ、管、ホース等の輸送手段(2)(図2の7)を設け、支流として検体液の一部を本発明のエンドトキシン濃度の測定装置の測定回路(図3(A)の15)内に取込む。

【0020】1.2 測定セル

本発明において測定セル(図3(B)の16、図4の16)とは、検体液中のエンドトキシンの濃度を測定するセル(部屋)であり、本発明で使用する微粒子計数計の一部を構成し、エンドトキシンとリムルス試薬が反応して凝固蛋白(微粒子)を発生した混合液に、ここにおいて光源からの光束を照射し微粒子の数を計測する。測定セルは下記にて詳細に説明する測定回路の一部である。測定セルの素材としては、光に対する透明性が要求されるので高純度ガラス、石英ガラスなどが好ましい。

【0021】1.3 測定回路

本発明において測定回路(図3(A)の15、図4の15)とは、検体液をリサイクル(循環)させる回路であり、上記した測定セルを一部に含み、残部は検体液をリサイクルできる構造であれば如何なる構造であってもよいが、円形のパイプ(管)で構成されていることが好ましい。パイプ(管)の材質については、特に限定されないが、ポリ四弗化エチレン(テフロン(R))、弗素樹脂、ライニングした金属、非ライニング金属、セラミックス等が挙げられ、非吸着性、洗浄性等の観点からポリ四弗化エチレン(テフロン(R))が特に好ましい。なお、混合液量は少量に限られるが、本発明においては、測定回路内を循環させることによって微粒子計数計による測定の必要条件である測定セル内の流動状態を継続させることができるとともに、検体液とリムルス試薬の混合と反応を均一にして測定精度を高める効果があり、本発明で始めて提案されたものである。測定回路の一部に

スタティックミキサーを設けることによって、混合を早く確実にすることができる。

【0022】1.4 取込み手段

本発明において取込みとは、エンドトキシンを含む検体液を測定セルを含む測定回路内に取込むことであり、その手段としては、上記1.1にて説明したパイプ、管、ホース等の輸送手段(2)(図2の7)である。輸送手段(2)の構造は、検体液を輸送できる構造であれば如何なる構造であってもよいが、円形のパイプ(管)で構成されていることが好ましい。パイプ(管)の材質については、特に限定されないが、ポリ四弗化エチレン(テフロン(R))、弗素樹脂、ライニングした金属、非ライニング金属、セラミックス等が挙げられ、非吸着性、洗浄性等の観点からポリ四弗化エチレン(テフロン(R))が特に好ましい。なお、検体液の取込みポンプ4は補助的なポンプであり、検体液が圧送されているラインから取込む場合は省略できる。また、検体液の濾過フィルター5は、検体液中の微粒子計数計が計数する最小径以上の微粒子の数が少ない場合は省略することができる。

【0023】1.5 封鎖する手段

本発明において封鎖とは、エンドトキシンを含む検体液を測定セルを含む測定回路内に封鎖することであり、測定回路の入口と出口を封鎖し、測定回路を形成させ、エンドトキシンを含む検体液を測定回路内で循環できるようにするものであり、封鎖手段としては、測定回路の入口と出口を封鎖できれば如何なる構造のものであってもよいが、仕切弁(ゲートバルブ)、球形弁(グローブバルブ)、コック(プラグバルブ)、ボールバルブ等が挙げられる。洗浄液を注入する弁9とリムルス試薬を注入する弁12は、チェックバルブまたは注射針などの細管による穿孔を、細管を抜去すれば自己閉鎖する能力を持つ仕切りにすることができる。具体的には、図3において、V1、V3、V4等のバルブ、または、開閉可能な仕切りを閉じた状態にしておけばよい。V3の替わりにリムルス試薬注入器10を設けた場合は、リムルス試薬注入器が閉の状態にしておけばよい。

【0024】2. 取込み封鎖された検体液を測定回路内で循環させる手段

本発明において、取込み封鎖された検体液を測定回路内で循環させる手段としては、ポンプ(図3の17、図4の17)を使用する。

【0025】3. 循環する検体液に所定量のリムルス試薬を注入して両液を混合させる手段

本発明において、循環する検体液に所定量のリムルス試薬を注入して両液を混合し混合液をつくる手段としては、ポンプを使用するが、上記の2.に記載したポンプを兼用してもよい。ポンプは洗浄し易いダイヤフラムポンプの使用が好ましい。なお、測定回路内に、両液の混合を良くするために、ミキサー18をオプションとして

設置してもよい。ミキサー18としては、各種スタティックミキサー、繊維集合体等がある。リムルス試薬を注入する手段は、リムルス試薬を注入できる形態であれば、いかなる形態であってもよいが、例えば、マイクロポンプ（吐出口のチェックバルブが弁12を兼ねても良い）、又はマイクロモーターで位置制御可能な注入針付きマイクロシリンジ（リムルス試薬注入器10と呼ぶこともある）等が挙げられる。リムルス試薬注入器10を用いる場合は、開閉バルブ12の位置に開閉バルブに替えて注射針などの細管による穿孔を、細管を抜去すれば自己閉鎖する能力を持つ仕切りにする。この場合、リムルス試薬注入パイプ11は、使用しなくてもよい。

#### 【0026】4. 微粒子計数手段

本発明において、微粒子計数手段とは、測定回路に導入された混合液中に発生する濁度の原因となる微粒子の計数値の経時変化を連続的に測定し、その測定値を処理して検体中のエンドトキシン濃度を算定する手段であり、光源（図4の13、図5の13）と、光検出器（図4の14、図5の14）と、光検出器の出力を演算し、表示、記録する電子回路と、測定セルから構成される。かかる微粒子計数手段に使用できる微粒子計数計の一例としては、日本特許第3151036号に記載されている下記的手段が挙げられる。すなわち、微粒子計数手段はコヒーレント光源13と、このコヒーレント光源からの光を集光する光学系と、この光学系で集光された光束の焦点の近傍に配置され且つ内部を微粒子を含む流体の流れが通過する測定セル16と、光束の光路上で且つ測定セル16に対して光束の光源とは反対側に配置された光検出器14と、この光検出器14からの電気信号から流体中の微粒子の個数を計測する電気回路23とによって構成することができる。コヒーレント光源からの光束の集光はレンズで行うことができる。

【0027】測定セルはガラス等の任意の材料で作ることができるが、光束が通過する部分は透明でなければならない。コヒーレント光源としては半導体レーザを用いることができ、光検出器はフォトダイオードにすることができる。コヒーレント光源はレーザ発振器とコリメータレンズとで構成することができる。レーザ発振器としては任意のものをを用いることができるが、発振波長が短ければ短いほど検出感度は向上する。検出方法の特徴は光源に発振出力の小さいレーザ発振器、例えば半導体レーザを用いることができる点にある。出力が1mW以下、具体的には0.2mWの半導体レーザでも測定が可能である。

【0028】集光系と光学レンズの焦点距離は検出したい微粒子の大きさによって選択する。例えば粒径が0.2 $\mu$ mの微粒子を検出する場合には $f=10$ mmの焦点距離のレンズを用いることができる。測定セルは、少なくとも集束光の受光面および透過面を透明にする必要がある。この測定セルは迷光を心配する必要がないの

で、単純な構造にすることができるが、微粒子を含んだ被検流体の流れに乱流が発生しないようにする手段、例えば層流板を光学セル内に設けておくのが好ましい。実際の装置では、レーザから出て集束された集束光が測定セルの所定の位置、例えば測定セルの中心に集光されるように光学レンズを配置するための位置調節手段を設けるのが好ましい。

【0029】光検出器14の役目は透過光に隠れている回折像を検出することにあるので、感度はそれほど必要としない。原理的には単一のフォトダイオードを用いることができるが、フォトダイオードアレイを用いるのが好ましい。このフォトダイオードアレイは被検出粒子を含む流れの方向に対しては垂直に配置し且つ光軸に対しても垂直に配置するのが好ましい。上記の微粒子計数手段を用いて、コヒーレント光源からの光束を集光し、微粒子を含む流体の流れを集束された光束の焦点の近くを通過させ、流体中の微粒子によって回折された回折光を微粒子を含む流体の流れに対して光束の光源とは反対側の光束の光路上に配置した光検出器によって検出して電気信号に変換し、この電気信号から流体中の微粒子の個数を計測することにより最小直径が0.5 $\mu$ m以下の微粒子の検出（測定）を行うことができる。

#### 【0030】5. 排出する手段

本発明において排出とは、エンドトキシンを含む検体液を測定セルを含む測定回路内に取込み、取込み封鎖された検体液を測定回路内で循環させ、循環する検体液に所定量のリムルス試薬を注入して両液を混合させ、混合液の微粒子の経時変化を連続的に測定後に、該混合液を測定回路内から排出することであり、その手段としては、パイプ、管、ホース等の輸送手段（図3の20）と、輸送動力源としての循環ポンプである。なお、排出パイプの開閉バルブは、混合液を測定回路内で循環させるときは、閉まった状態になっており、混合液を排出させる場合は、開いた状態になっている。

【0031】輸送手段の構造は、検体液を輸送できる構造であれば如何なる構造であってもよいが、円形のパイプ（管）で構成されていることが好ましい。パイプ（管）の材質については、特に限定されない。軟質チューブ（シリコーンゴム、軟質PVC）の使用も可能である。

#### 【0032】6. 汚過手段

本発明において、汚過手段とは、エンドトキシンを含む検体液を測定回路内に取込む前に、微粒子計数手段が計数する最小径以上の粒子を予め除去できる手段（図2の5、図4の5）であり、検体液中の活性成分を吸着し難いセラミック製マイクロフィルター、弗素樹脂製マイクロフィルター等が特に好ましい。なお、マイクロフィルターの後に気泡を除去する脱気手段（図示せず）を設けることが好ましい。この項における手段の説明は、請求項2に対応するものである。

### 【0033】7. 複数測定系の自動切換え連続測定手段

本発明において、複数測定系の自動切換え連続測定手段とは、請求項4の「複数の測定系を検体液の流路に並列に切換え可能に結合して、順繰りに自動切換えて連続測定する手段」であり、2つのケースがあり、請求項5の「複数の測定系は、単一の光源とそれに対応する光検出器を固定した回転軸を中心軸とする同心円周上に配置した複数の測定セルとからなる」ケースと、請求項6の「複数の測定系は、複数の測定セルに対して併進往復する単一の光源とそれに対応する光検出器とからなる」ケースがある。請求項5のケースは、下記の7. 1に、請求項6のケースは、下記の7. 2に更に詳細に説明する。

【0034】ここにおいて、複数の測定系とは、単数の測定系が2つ以上並列に配置されたものを意味する。単数の測定系とは、図1の(A)に概念図を示すように、検体液を取込み封鎖する手段1、検体液の測定手段2及び検体液を排出し封鎖する手段3からなる1ユニットのエンドトキシン濃度の測定装置における測定手段2であり、2つの測定系とは図1の(B)に示すように、1つ(単数)の測定系が2系列あり、並列になっているものであり、これを更に具体的に構成したものを図4に示す。3つの測定系とは図1の(C)に示すように、1つ(単数)の測定系が3系列あり、並列になっているものである。

【0035】なお、検体液を取込み封鎖する手段1とは、上記した各手段の結合構造であり、図2(A)に示した結合構造であり、検体液取込みパイプ7と、濾過フィルター5、洗剤液注入パイプ8と、検体液開閉バルブ6と、洗剤液開閉バルブ9から構成される。なお、濾過フィルター5の後に、脱気手段(図示せず)を設けてもよい。検体液の測定手段2とは、図3(A)と、図3(B)に示した結合構造であり、測定回路15と、測定セル16と、光源13と、検出器14と、循環ポンプ17と、リムルス試薬注入パイプ11と、開閉バルブ12と、ミキサー18(オプション)から構成される。検体液を排出し封鎖する手段3とは、図3(A)に示した、排出パイプ20と、排出パイプの開閉バルブ19との結合構造である。

【0036】なお、複数の測定系の場合、検体液の取込み手段の一部は兼用できるので、図2の(B)や(C)のように、濾過フィルター5を含めた部分より上流は、1つの検体液の取込みパイプ7と1つの濾過フィルター5より構成され、これらより下流は兼用できないので、パイプも、2本や3本に分かれている。複数の測定系にするほど、図6に示すようにエンドトキシンの濃度測定の間隔を短縮することが可能となる効果がある。

【0037】7. 1 単一の光源とそれに対応する光検出器を固定した回転軸を中心軸とする同心円上に配置し

### た複数の測定セル

本発明においては、原則として1つの測定系(測定セル)に対して、一組の光源と光検出器を用いるが、光源と光検出器は高価格のものであるから、複数の測定系(測定セル)の場合に各測定系(測定セル)に一組の光源と光検出器を付けるとコストアップとなるので、単一の光源とそれに対応する光検出器を測定装置の特定部分に固定し、その特定部分を複数の測定セルに対して回転して各測定系に順次対応させて、測定セル内の微粒子の数を測定する。コストと濃度測定装置の容積や重量を省き、小型化し、省スペースと持ち運びを容易にし、メンテナンスの回数も減らせる効果がある。

【0038】この項における手段の説明は、請求項5に対応するものであり、図5(A)と(B)に基づき更に詳細に説明する。図5(A)では、1つの測定系(測定セル16)に対して、一組の光源13と検出器14を用いており、この一組13+14を長方形で囲んで表現してある。図5(B)では、上段に4つの測定系(測定セル16が①②③④と4個並べてある。)が示してあり、中段に固定された回転移動可能な一組の光源13と光検出器14があり、13+14を長方形で囲んで表現してある。複数の測定系は、単一の光源とそれに対応する光検出器を固定した回転軸を中心軸とする同心円周上に配置した複数の測定セルを含む測定回路とからなり、上段の左端に固定された一つの測定系(測定セル16①)に、中段にある回転移動可能な一組の光源13と光検出器14が移動して合体し、下段の①の状態になり、微粒子の数が測定される。ついで、上段の左から2番目の固定された一つの測定系(測定セル16②)に、中段にある回転移動可能な一組の光源13と光検出器14が移動して合体し、下段の②の状態になり、微粒子の数が測定される。順次、③及び④の微粒子の数が測定される。回転軸を固定して、同心円周上に配置した複数の測定セルを含む測定回路を回転させてもよい。

### 【0039】7. 2 複数の測定セルに対して併進往復する単一の光源とそれに対応する光検出器

本発明においては、原則として1つの測定系(測定セル)に対して、一組の光源と光検出器を用いるが、光源と光検出器は高価格のものであるから、複数の測定系(測定セル)の場合に各測定系(測定セル)に一組の光源と光検出器を付けるとコストアップとなるので、複数の測定セルに対して併進往復する単一の光源とそれに対応する光検出器を付け、コストダウンと濃度測定装置の容積や重量を省き、小型化し、省スペースと持ち運びを容易にし、メンテナンスの回数も減らせる効果がある。

【0040】この項における手段の説明は、請求項6に対応するものであり、図6(A)と(B)に基づき更に詳細に説明する。図6(A)では、1つの測定系(測定セル16)に対して、一組の光源13と光検出器14を



用いており、この一組13+14を長方形で囲んで表現してある。図6(B)では、上段に移動可能な一組の光源13と光検出器14が示してあり、13+14を長方形で囲んで表現してある。矢印で移動を示し、下段にそれぞれ固定されている4個所の測定系(測定セル16が①②③④と4個並べてある。)に合体する。すなわち、移動可能な一組の光源13と光検出器14の一組(13+14)が、下段の①の状態にある測定系(測定セル16)に合体し微粒子の数が測定される。次いで、移動可能な一組の光源13と光検出器14の一組(13+14)が、下段の②の状態にある測定系(測定セル16)に合体し微粒子の数が測定される。さらに、③および④の状態にある測定系(測定セル16)に合体し微粒子の数が測定される。

【0041】8. エンドトキシン濃度の測定装置  
本発明のエンドトキシン濃度の測定装置とは、上記した各手段を有機的に結合した構造体である。上位概念的には、単数の測定系の場合、図1の(A)に概念図を示すように、検体液を取込み封鎖する手段1、検体液の測定手段2及び検体液を排出し封鎖する手段3からなる1ユニットのエンドトキシン濃度の測定装置である。2つの測定系の場合は、図1の(B)に示すように、1つ(単数)の測定系が2系列あり、並列になっている2ユニットのエンドトキシン濃度の測定装置である。これを更に具体的に構成したものを図4に示す。3つの測定系の場合は、図1の(C)に示すように、1つ(単数)の測定系が3系列あり、並列になっている3ユニットのエンドトキシン濃度の測定装置である。

【0042】9. エンドトキシン濃度の測定方法  
本発明において、本発明のエンドトキシン濃度の測定装置をもちいて、下記の方法でエンドトキシンの濃度を測定する。まず、エンドトキシンを含む検体液(注射液、輸液、透析液などの医薬品と、その中間製品又はこれらの原料の一部となる精製水など)が貯蔵されている貯槽、タンク、ガラス瓶、プラスチック容器、プラスチックバッグ等の貯蔵手段から、または、これらが流れている供給ラインからパイプなどの取込み手段により、検体液を測定セルを含む測定回路にポンプで輸送する。なお、圧送されている供給ラインからの場合は、ポンプは省略できる。この場合、測定回路内に取込む前に、前記パイプの一部に設けられている濾過器で、微粒子計数手段が計数する最小径以上の粒子を除去する。次いで、測定回路内に検体液を入れたのち、測定回路の入口と入口のバルブを閉じて測定回路を閉回路とする。

【0043】次いで、測定回路内の検体液を循環させる。リムルス試薬注入パイプのバルブを開き、測定回路内の循環している検体液に所定量のリムルス試薬を注入し、検体液とリムルス試薬を循環させ両者の混合液をつくり、ゲル化反応の過程で発生する微粒子の経時変化を連続的に測定する微粒子計数手段で測定してエンドトキ

シンの濃度を算定する。測定の終了後、混合液を測定回路内から排出する。そのためには、取入れバルブ6と排出パイプのバルブ19を開き、新たに取り入れる検体液で測定回路内の測定済み混合液を排出パイプから廃棄する。この場合、測定回路内を洗浄するために、洗浄液パイプのバルブ9を開き、洗浄液を測定回路内に導入し、内部を洗浄し、または、一定時間循環・滞留させた後、測定回路内の混合液を洗浄液と共に流出させ廃棄してもよい。

【0044】10. 検体液中のエンドトキシン濃度が低レベルの場合の測定方法

通常は、検体液量とリムルス試薬量は1:1の比率で両液を混合して得られる0.1~0.2mlの混合液の濁度を静止状態で測定してエンドトキシンの濃度測定を行う。しかしながら、濁りの原因である微粒子の数(から演算して濃度)を微粒子計数計で測定するためには、混合液を光束を横切って流動させることが必要条件である。しかし、通常の混合液体0.1~0.2mlでは、循環であっても、そのための余分の容積が必要になって流動させることが非常に困難である。混合液をふやそうとしても、リムルス試薬は非常に高価格のものであるから、検体液量に対して使用量を等量で増やすことは経済的な負担増が非常に大きくなり、微粒子計数計で測定する場合の大きい障害になる。通常量の検体液と混合させたリムルス試薬の大部分は、検体液のエンドトキシン濃度が低い場合はエンドトキシンと反応しないで残ると考えられる。したがって試薬量に対して10倍量~1000倍量の検体液を混合しても、検体液中のエンドトキシンがリムルス試薬と反応する量は等量混合の場合と殆ど変わらないと考えられる。即ち、本発明では、エンドトキシンの濃度が低い検体液を対象として測定するので、検体液量をリムルス試薬量に対して10倍量~1000倍量とした後、両液を混合して得られる混合液を使用することによってゲル化反応の過程で発生する微粒子を測定することが、始めて可能となった。この項における方法の説明は、請求項7に対応するものである。

【0045】11. 並列の測定セルが3系列の場合の自動切替えダイアグラム

図1(C)に示すように、測定セルが3系列の場合には、第1系列、第2系列、及び第3系列が一定の時間の間隔を置いて、順次、微粒子の測定を行い、次いで各系列の洗浄液による洗浄を一定の時間の間隔を置いて、順次行う。洗浄が終われば、また順次微粒子の測定を行う。並列の測定セルが3系列の場合の自動切替えダイアグラムを図9に示した。なお、本発明において、洗浄液は糖脂質と蛋白を溶解するものであって、微量が残留した場合でも、検体液、エンドトキシン、リムルス試薬などに悪影響を及ぼさず、エンドトキシンとリムルス試薬との反応を促進したり阻害しないものであれば、いかなるタイプのものであってもよく、塩酸水溶液や界面活性

剤から選択することができる。

【0046】12. 特に好ましい実施の形態

エンドトキシンとリムルス試薬が反応して発生する濁度を測定する比濁法において、エンドトキシン濃度が低い検体液の測定法として、予め設定した濁度に到達する時間を測定する比濁反応時間法、または、濁度の経時変化率を測定する比濁反応速度法がよく用いられる(竹沢真吾編、透析液エンドトキシンがよくわかる本、37～38頁(1995)、東京医学社)。

【0047】エンドトキシンの濃度が低い場合は、予め設定した濁度に到達する時間の対数がエンドトキシン濃度の対数または2回対数に反比例して長くなるため、設定濁度を測定可能な最低値に設定して測定時間を最短にすることがモニターに要求される。従って、より低い濁度で測定することが重要である。そこで、高感度測定法として、濁度計に替えて微粒子計数計を使用することが考えられる。

【0048】しかし、微粒子計数計の光束は細く、その中に微粒子を捕捉する(=計数する)のは確率的な現象になるので、統計的に信頼できる計数(数十個以上)まで対象液を走査し(光束を固定して液を横断的に流し)、光束を横切った容積(横断流量×時間)で除して濃度を求める。即ち、微粒子の濃度が低くなると測定する容積を逆比例して大きくすることが必要になって、測定時間が一層長くなる。更に、濁度計の測定対象が限られた空間に保持されるのに対して、微粒子計数計の測定対象は光束を横切って流動させることが必須条件なので、測定対象である検体とリムルス試薬を混合した反応液の容積が0.2～0.1cm<sup>3</sup>と少量のため、反応液を測定セルに閉鎖系で循環させるとしても容易ではない。

【0049】【実施態様1】複数の装置を検体の流路に並列に切換え可能に結合して、順繰りに自動切換えて連続測定する方式の基本的な例として、2組の装置(1組の光源と受光器を共用することは可能)を対象液の流路に並列に切換え可能に結合して、順繰りに自動切換えて連続測定する実施態様を図5に示す。並列の装置が3系列の場合の自動切換え操作ダイアグラムの例を図9に示す。

【0050】【実施態様2】測定する反応液の量は、通常使用する試薬の量と等量の検体を混合して調製するので、0.1～0.2cm<sup>3</sup>と少量である。このため測定セルの容積を0.1cm<sup>3</sup>以下にすることが必要になる。しかし、リムルス試薬は、濃度10<sup>3</sup>EU/L桁以上のエンドトキシンに対応できる量の活性成分を、通常の使用量0.1～0.05cm<sup>3</sup>中に含有している筈である。従って、10<sup>1</sup>EU/L桁のレベルの検体の場合は、通常量の検体液と混合させたりリムルス試薬の大部分はエンドトキシンと反応しないで残ると考えられる。試薬量に対して10倍量～1000倍量の検体液を混合し

ても、検体液中のエンドトキシンがリムルス試薬と反応する量は等量混合の場合と殆ど変わらないと考えられる。本発明では、エンドトキシンの濃度が低い検体液を対象として測定するので、検体液量をリムルス試薬量に対して10倍量～1000倍量とした後、両液を混合して得られる混合液を使用してゲル化反応の過程で発生する微粒子を測定することが、始めて可能となった。即ち、混合液量は1～20cm<sup>3</sup>になり、混合液を測定セルに循環することが混合液量が0.1～0.2cm<sup>3</sup>の場合に比較して格段に容易にできる。

【0051】【実施態様3】濁度計が測定する微粒子の寸法を小さくすることで感度を高くすることが期待される。エンドトキシンとリムルス試薬が反応して濁りの原因である微少な凝固体(微粒子)を発生し、会合して最終的にゲル化する過程で微粒子数は寸法の約三乗に逆比例して減少する。従って、測定する微粒子の寸法を小さく設定することは、光束を細く絞ることによって測定する混合液の容積は減少するが、それ以上に光束を横切る微粒子の頻度が高くなり、結局、測定時間は微粒子数の寸法に略々逆比例して短くなる。また、検出寸法を小さく設定できることはエンドトキシンとリムルス試薬のゲル化反応の過程の早い時期に測定できることになり、測定時間の短縮に貢献することになる。

【0052】エンドトキシン濃度が1[E.U./L]と極低い検体液の凝固体微粒子濃度(計数的濃度)を推定すると、エンドトキシンの重量濃度は0.2[ng/L](E.coli 0113:H10由来の場合、既出「透析液ETのよくわかる本」ページ29)になり、透析液中のエンドトキシンは会合した状態で分子量が約10<sup>6</sup>[g/mol]程度なので、1.2×10<sup>8</sup>[個/L]程度の個数濃度になる。他方、分子量が約10<sup>6</sup>の両親媒性会合体の直径は約(1～2)×10<sup>-2</sup>[μm]と推定され、これらがリムルス試薬との反応で発生した凝固体が段々集合して、微粒子計数計の下限寸法、例えば、直径0.1→0.5→0.1[μm]に成長すると、最初の未反応ETの微粒子としての濃度約1.2×10<sup>8</sup>[個/L]は直径比の3乗に逆比例して減少し、微粒子計数計の検出下限、例えば、0.1[μm]で10<sup>2</sup>～10<sup>3</sup>個/mL、0.5[μm]で10<sup>0</sup>～10<sup>1</sup>個/mL、1[μm]で10<sup>-2</sup>～10<sup>-1</sup>個/mLになる。

【0053】この凝固体濃度を微粒子計数器で測定しようとする場合、透析液中に存在する気泡(予め脱気して除去する)や塵などの微粒子(予め濾過して除去する)の除去しきれなかったものがノイズとして妨害するため、エンドトキシン由来の微粒子の計数がノイズ数のレベルまで低下した状態で測定することは測定値の信頼度を失う。従って、検体のエンドトキシン濃度が低い程、凝固体微粒子径が小さい段階で測定することが必要である。エンドトキシン濃度が1EU/Lの場合は、0.5



$\mu\text{m}$ まで成長した段階で $10^1$ 個/ $\text{mL}$ 以下になると推算され、検体によってはノイズに埋没する場合もあるため、少なくとも $0.5\mu\text{m}$ 程度以下、好ましくは $0.2\sim 0.1\mu\text{m}$ 程度で計数することが微粒子計数型濁度計でエンドトキシン濃度を測定する必須条件になる。この条件は、エンドトキシンとリムルス試薬の反応の早い段階で測定することによって測定時間を短縮する目的にも一致する。

【0054】

【実施例】以下に、実施例に基づいて本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例によって限定されるものではない。

【0055】【実施例1】検体液取込みパイプ7、開閉バルブ6、洗剤液注入パイプ8（図省略）、開閉バルブ9（図省略）、濾過フィルター5（図省略）、脱気装置（図省略）、リムルス試薬注入パイプ11、開閉バルブ12、測定回路15、測定セル16、循環ポンプ17、スタティックミキサー18（図省略）、開閉バルブ19、排出パイプ20、恒温槽21（図省略）及び移動可能な光源13と光検出器14の結合体からなる1系列のエンドトキシン濃度測定装置が、並列に3系列が並び設置されたエンドトキシン濃度測定装置を作成した。これを図7に示す。

【0056】【実施例2】実施例1において、リムルス試薬注入パイプ11及び開閉バルブ12に替えて、マイクロモーターで位置制御可能な注入針付きマイクロシリンジ（リムルス試薬注入器10）を採用した以外は、実施例1の装置と同様な構造のエンドトキシン濃度測定装置を作成した。

【0057】

【発明の効果】本発明の装置によれば、注射液、輸液、透析液などの医薬品と、その中間製品、精製水などの検体液の貯蔵タンク又は供給ラインから、検体液の一部をパイプで取込みエンドトキシンの濃度を連続的にモニターすることができ、かつエンドトキシンの濃度が $50\text{EU/L}$ 以下の低濃度液、特に $10\sim 1\text{EU/L}$ レベルの極低濃度液であってもモニターでき、しかもエンドトキシンの濃度を短時間にモニターできる効果がある。

【図面の簡単な説明】

【図1】装置の構成を示す概念図である。図（A）は、検体液を取込み封鎖する手段と、検体液の測定手段と、検体液を排出し封鎖する手段が1系列の場合であり、図（B）は、2系列の場合であり、図（C）は、3系列の場合である。

【図2】検体液を取込み封鎖する手段の例を示す図である。図（A）は、混合液が測定回路を循環している場合であり、図（B）は、測定回路の上部の一部は測定セルとなっていることを示す図である。

【図3】検体液の測定手段の例を示す図である。図（A）は、1系列の場合であり、図（B）は、2系列の場合であり、図（C）は3系列の場合である。

【図4】複数の装置を並列に設置して、自動切換えて順繰りに連続測定する装置の例を示す図である。

【図5】単一の光源とそれに対応する光検出器を中心として回転する複数の測定セルを示す図である。

【図6】複数の測定セルに対して併進往復する単一の光源とそれに対応する検出器を示す図である。

【図7】複数の測定系は、一列に並置した複数の測定セルに対して併進往復する単一の光源とそれに対応する光検出器とからなり、それを示す装置図である。図（A）は鳥瞰図、図（B）は側面図、（C）は平面図である。

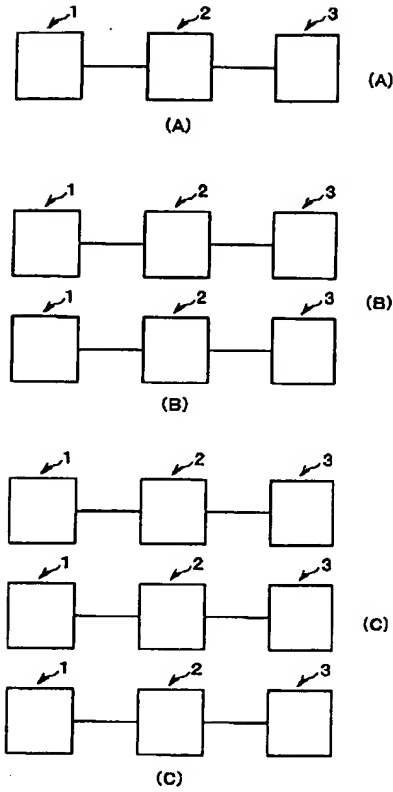
【図8】複数の測定系は、単一の光源とそれに対応する光検出器を固定した回転軸を中心軸とする同心円周上に配置した複数の測定セルを含む測定回路とからなり、それを示す装置図である。図（A）は鳥瞰図、図（B）は側面図、（C）は平面図である。

【図9】並列の測定セルが3系列の場合の自動切替えダイアグラムを示す図である。

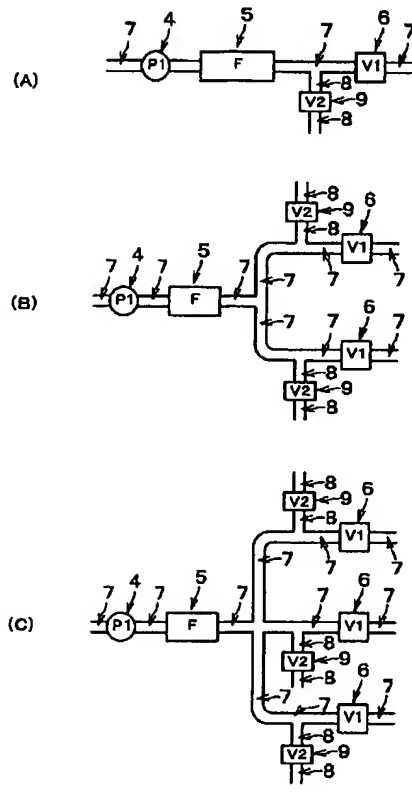
【符号の説明】

- |      |                            |
|------|----------------------------|
| 1    | 検体液を取込み封鎖する手段              |
| 2    | 検体液の測定手段                   |
| 3    | 検体液を排出し封鎖する手段              |
| 4    | 検体液の取込みポンプ                 |
| 5    | 検体液の濾過フィルター                |
| 6    | 検体液取込みパイプの開閉バルブ            |
| 7    | 検体液取込みパイプ                  |
| 8    | 洗剤液注入パイプ                   |
| 9    | 洗剤液注入パイプの開閉バルブ             |
| 10   | リムルス試薬注入器                  |
| 11   | リムルス試薬注入パイプ                |
| 12   | リムルス試薬注入パイプの開閉バルブ、または仕切り   |
| 13   | 光源                         |
| 14   | 光検出器                       |
| 15   | 測定回路                       |
| 15-1 | 循環混合液入口                    |
| 15-2 | 循環混合液出口                    |
| 16   | 測定セル                       |
| 17   | 循環ポンプ（取込みポンプ、洗浄・排出ポンプを兼ねる） |
| 18   | スタティックミキサー                 |
| 19   | 排出パイプの開閉バルブ                |
| 20   | 排出パイプ                      |
| 21   | 恒温槽                        |
| 22   | 光束                         |
| 23   | 電気回路（演算部）                  |

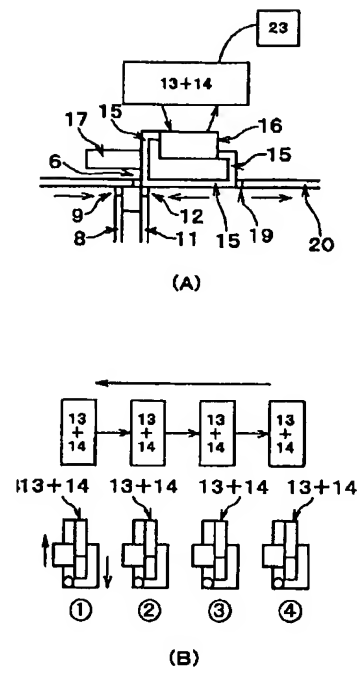
【図1】



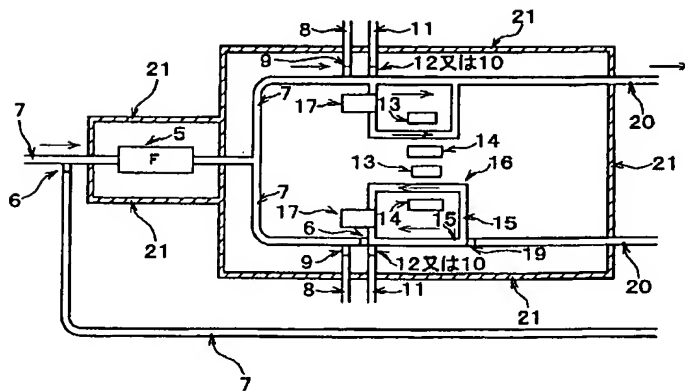
【図2】



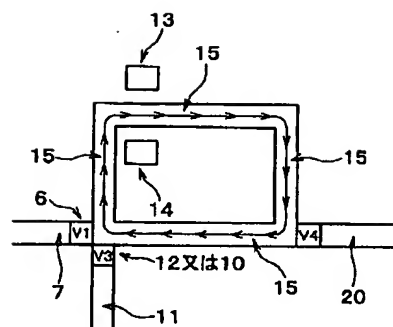
【図6】



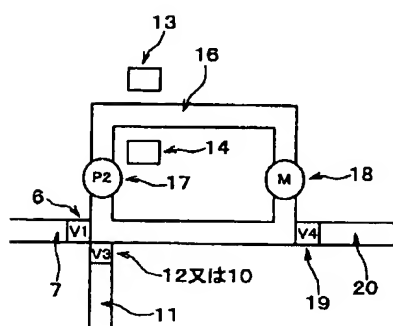
【図4】



【図3】

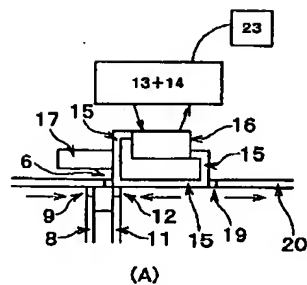


(A)

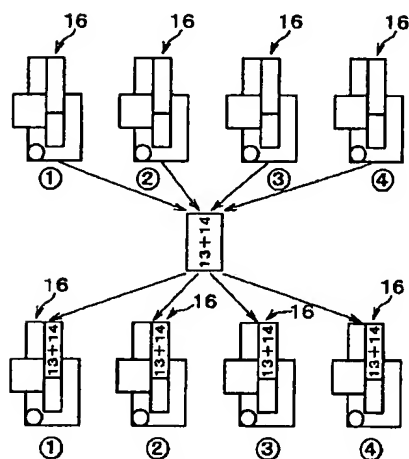


(B)

【図5】

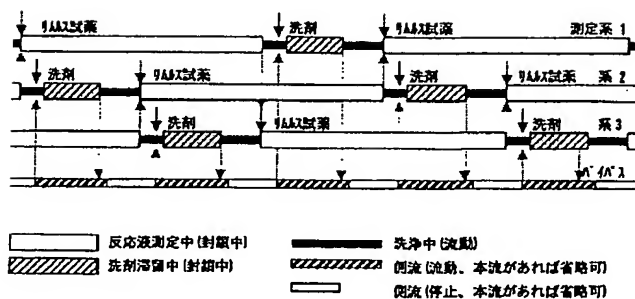


(A)



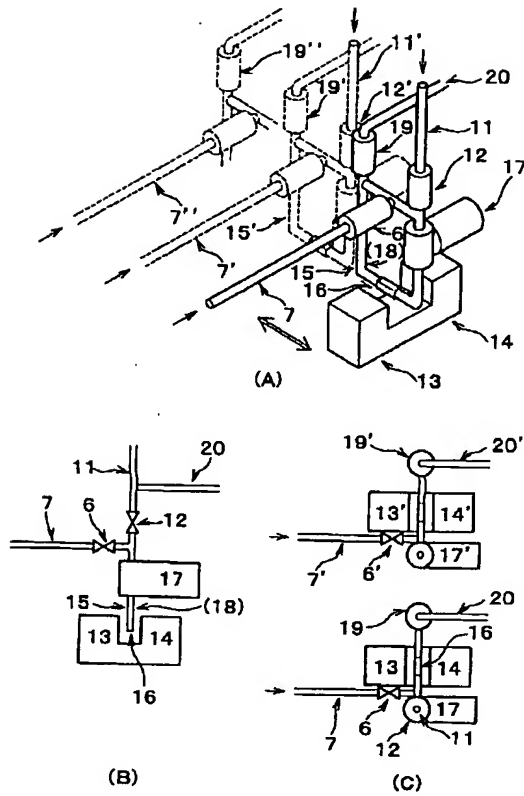
(B)

【図9】

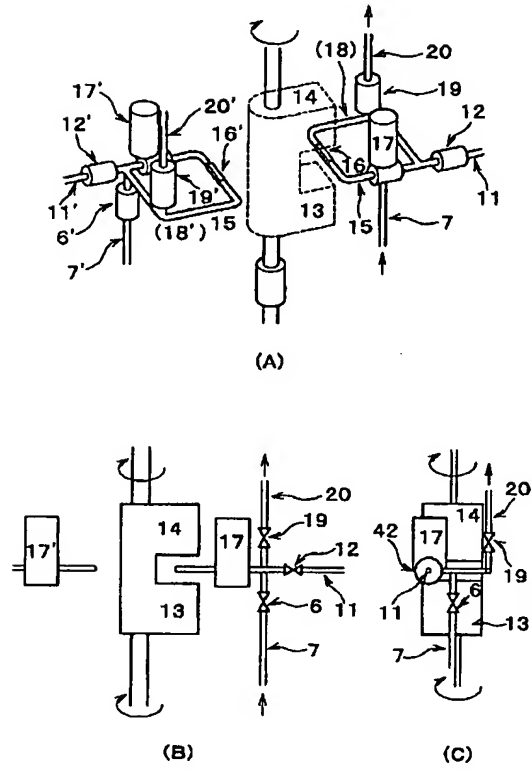


反応液測定中 (封鎖中)      洗浄中 (流動)  
 洗浄液滞留中 (封鎖中)      逆流 (流動、本流があれば省略可)  
 逆流 (停止、本流があれば省略可)

【図7】



【図8】



フロントページの続き

(72)発明者 原田 徳三  
大阪府大阪市阿倍野区王子町3-13-2  
(72)発明者 三浦 薫  
千葉県浦安市当代島2-8-1-401

Fターム(参考) 2G052 AA06 AB18 AB22 AD06 AD26  
AD49 BA03 BA14 CA03 CA04  
CA12 CA20 CA35 EA03 FB03  
FB06 FC04 FC11 FC15 GA09  
GA11 HC07 HC10 HC39 JA07